

SE REIVINDICA:

1. Una composición que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal, en donde la secuencia codificante de la glucosidasa alfa lisosomal carece de CpG con respecto a una secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal silvestre, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro que se une a CD63 o un dominio de suministro que se une a TfR.

2. Una composición que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal, en donde la secuencia codificante de la glucosidasa alfa lisosomal carece de CpG en relación con una secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal silvestre.

3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en donde el dominio de suministro de unión a CD63 se fusiona con la proteína alfa glucosidasa lisosomal a través de un enlazador peptídico.

4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa lisosomal.

5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la secuencia codificante de alfa glucosidasa lisosomal se optimiza por codones y carece de CpG.

8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la secuencia codificante de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al

menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 176.

9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la secuencia codificante de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212 y codifica una proteína glucosidasa alfa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173.

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 176 y codifica una proteína alfa-glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident. 173.

10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la secuencia codificante de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-

212, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica una proteína glucosidasa alfa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 176, tiene los codones optimizados y agotada en CpG, y codifica una proteína alfa-glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident. 173.

11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la secuencia codificante de alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 176.

12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la secuencia codificante de alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 176.

13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la secuencia codificante para el dominio de suministro de unión a CD63 se optimiza por codones o carece de CpG.

14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la secuencia codificante para el dominio de suministro de unión a CD63 se optimiza por codones y carece de CpG.

15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el dominio de suministro de unión a CD63 comprende una proteína de unión al antígeno anti-CD63.

16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el dominio de suministro de unión a CD63 comprende un anticuerpo anti-CD63, un fragmento de anticuerpo o un fragmento variable monocatenario (scFv).

17. La composición de la reivindicación 16, en donde el dominio de suministro de unión a CD63 es el fragmento variable monocatenario (scFv).

18. La composición de la reivindicación 17, en donde el scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183.

19. La composición de la reivindicación 17 o 18, en donde el scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 183.

20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 184-192, opcionalmente en donde la secuencia codificante del scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 186.

21. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 184-192 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 183, opcionalmente en donde la secuencia codificante del scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 184-192 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 183,

al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 186 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident. 183.

22. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 184-192, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 183,

opcionalmente en donde la secuencia codificante del scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 186, tiene los codones optimizados y agotada en CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident. 183.

23. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 184-192,

opcionalmente en donde la secuencia codificante del scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 186.

24. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde la secuencia codificante de scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 184-192, opcionalmente en donde la secuencia codificante del scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 186.

25. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones o carece de CpG.

26. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-25, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG.

27. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193.

28. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en donde la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193.

29. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en donde la secuencia codificante de la

proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196,

opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736.

30. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-29, en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 193,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193.

31. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-30, en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202 y está optimizada por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 193,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196 y se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 736, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 193.

32. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-31, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 196,

opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736.

33. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-32, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 196,

opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736.

34. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-33, en donde el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio.

35. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-34, en donde el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación

corriente abajo de la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio.

36. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-35, en donde el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio, y el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio.

37. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-36, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología.

38. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-36, en donde el constructo de ácido nucleico comprende brazos de homología.

39. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-38, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio.

40. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-38, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a

un promotor, opcionalmente en donde el promotor es un promotor específico del hígado.

41. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-40, en donde el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario o ADN bicatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario.

42. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-41, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio, y

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología.

43. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-42, en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector de ácido nucleico o una nanopartícula lipídica.

44. La composición de la reivindicación 43, en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en el vector de ácido nucleico.

45. La composición de la reivindicación 44, en donde el vector de ácido nucleico es un vector viral.

46. La composición de la reivindicación 43 o 44, en donde el vector de ácido nucleico es un vector viral adenoasociado (AAV), opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

47. La composición de la reivindicación 46, en donde el vector AAV es un vector AAV monocatenario (ssAAV).

48. La composición de la reivindicación 46 o 47, en donde el vector AAV se deriva de un vector AAV8, un vector

AAV3B, un vector AAV5, un vector AAV6, un vector AAV7, un vector AAV9, un vector AAVrh.74, o un vector AAVhu.37.

49. La composición de la reivindicación 48, en donde el vector AAV es un vector AAV8 recombinante (rAAV8).

50. La composición de la reivindicación 49, en donde el vector AAV es un vector rAAV8 monocatenario.

51. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-50, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y

en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

52. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-51, en donde el constructo de ácido nucleico carece de CpG.

53. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-51, que comprende además un agente de nucleasa que se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana.

54. La composición de la reivindicación 53, en donde el locus genómico diana es un gen de *albúmina*, opcionalmente en donde el gen de *albúmina* es un gen de *albúmina* humano.

55. La composición de la reivindicación 54, en donde el sitio diana de la nucleasa se encuentra en el intrón 1 del gen *albúmina*.

56. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-55, en donde el agente nucleasa comprende:

- (a) una nucleasa con dedos de zinc (ZFN);
- (b) una nucleasa efectora similar al activador de la transcripción (TALEN); o
- (c) (i) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y
(ii) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas para la secuencia diana del ARN guía.

57. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-55, en donde el agente nucleasa comprende:

- (a) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y
- (b) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas para la secuencia diana del ARN guía.

58. La composición de la reivindicación 57, en donde la secuencia diana del ARN guía se encuentra en el intrón 1 de un gen *albúmina*.

59. La composición de la reivindicación 58, en donde el gen *albúmina* es un gen *albúmina* humano.

60. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-59, en donde:

- (I) el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19, o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41; y/o
- (II) el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41.

61. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-60, en donde el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41.

62. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-61, en donde el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41.

63. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-62, en donde el ARN guía comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 62-125, opcionalmente en donde el ARN guía comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, y 105.

64. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-63, en donde:

(I) el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19, o al menos 20 nucleótidos contiguos de la sec. con núm. de ident.: 36; y/o

(II) el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 36.

65. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-64, en donde el segmento dirigido al ADN comprende la sec. con núm. de ident.: 36.

66. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-65, en donde el segmento dirigido al ADN consiste en la sec. con núm. de ident.: 36.

67. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 68-66, en donde el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100.

68. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-67, en donde el ARN guía se encuentra en la forma de ARN.

69. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-68, en donde el ARN guía comprende al menos una modificación.

70. La composición de la reivindicación 69, en donde al menos una modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metilo.

71. La composición de la reivindicación 69 o 70, en donde al menos una modificación comprende una unión de fosforotioato entre nucleótidos.

72. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 69-71, en donde al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los primeros cinco nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

73. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 69-72, en donde al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

74. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 69-73, en donde al menos una modificación comprende uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

75. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 69-74, en donde al menos una modificación comprende uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

76. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 69-75, en donde al menos una modificación comprende nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

77. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 69-76, en donde al menos una modificación comprende nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

78. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 69-77, en donde al menos una modificación comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

79. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 69-78, en donde el ARN guía es un ARN guía único (ARNsg).

80. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 69-79, en donde el ARN guía en la forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

81. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-80, en donde la proteína Cas es una proteína Cas9.

82. La composición de la reivindicación 81, en donde la proteína Cas9 se deriva de una proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, una proteína Cas9 de *Staphylococcus aureus*, una proteína Cas9 de *Campylobacter jejuni*, una proteína Cas9 de *Streptococcus thermophilus*, o una proteína Cas9 de *Neisseria meningitidis*.

83. La composición de la reivindicación 81, en donde la proteína Cas se deriva de una proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes*.

84. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-83, en donde la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 11.

85. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-84, en donde el ácido nucleico que codifica la proteína Cas se optimiza por codones para la expresión en una célula de mamífero o una célula humana.

86. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-85, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas.

87. La composición de la reivindicación 86, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas comprende al menos una modificación.

88. La composición de la reivindicación 86 o 87, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas se modifica para comprender una uridina modificada en una o más o en todas las posiciones de uridina.

89. La composición de la reivindicación 88, en donde la uridina modificada es pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina.

90. La composición de la reivindicación 88 o 89, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye totalmente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina.

91. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 86-90, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas comprende una caperuza en 5'.

92. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 86-91, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas comprende una secuencia de poliadenilación.

93. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 86-92, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núms. de ident.: 226, 225, o 12.

94. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-93, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núms. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye totalmente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación.

95. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-94, en donde el ARN guía en la forma de ARN y el ARN guía comprenden la sec. con núm. de ident.: 68 o 100, y

en donde la composición comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225, o 12.

96. La composición de la reivindicación 95, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio, y una señal o secuencia de poliadenilación,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

97. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-94, en donde el ARN guía en la forma de

ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía, y en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 226, 225, o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye totalmente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación.

98. La composición de la reivindicación 97, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio, y una señal o secuencia de poliadenilación,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

99. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-98, en donde la proteína Cas o el ácido

nucleico que codifica la proteína Cas y el ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía se asocian con una nanopartícula lipídica.

100. La composición de la reivindicación 99, en donde la nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico, un lípido neutro, un lípido auxiliar, y un lípido sigiloso.

101. La composición de la reivindicación 100, en donde el lípido catiónico es el Lípido A ((9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato).

102. La composición de la reivindicación 100 o 101, en donde el lípido neutro es diestearoilfosfatidilcolina o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC).

103. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 100-102, en donde el lípido auxiliar es el colesterol.

104. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 100-103, en donde el lípido sigiloso es 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metoxipoli-etilenglicol-2000 (PEG2k-DMG).

105. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 100-104, en donde el lípido catiónico es el

Lípido A, el lípido neutro es DSPC, el lípido auxiliar es colesterol y el lípido sigiloso es PEG2k-DMG.

106. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 99-105, en donde la nanopartícula lipídica comprende cuatro lípidos en las siguientes relaciones molares: aproximadamente 50 % mol de Lípido A, aproximadamente 9 % mol de DSPC, aproximadamente 38 % mol de colesterol, y aproximadamente 3 % mol de PEG2k-DMG.

107. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 99-106, en donde el gen *albúmina* es un gen *albúmina* humano,

en donde el ARN guía está en forma de ARN, y el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100,

en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225, o 12, y

en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende Lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente 50 mol % de Lípido A, aproximadamente 9 mol % de DSPC, aproximadamente 38 mol % de colesterol, y aproximadamente 3 mol % de PEG2k-DMG.

108. La composición de la reivindicación 107, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio, y una señal o secuencia de poliadenilación,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y

en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de

ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

109. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 57-106, en donde el gen *albúmina* es un gen *albúmina* humano,

en donde el ARN guía en la forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía,

en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 226, 225, o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye totalmente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación, y

en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende Lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente 50 mol % de Lípido A, aproximadamente 9 mol % de DSPC, aproximadamente 38 mol % de colesterol, y aproximadamente 3 mol % de PEG2k-DMG.

110. La composición de la reivindicación 109, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio, y una señal o secuencia de poliadenilación,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 194-202, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 196, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 736,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y

en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

111. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-110, para usar en un método para insertar el ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica multidominio en un locus genómico diana en una célula o una población de células.

112. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-110, para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio de un locus genómico diana en una célula o una población de células o para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células.

113. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-110, para usar en un método para insertar el ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica

multidominio en un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto.

114. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-110, para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio de un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto o para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células en un sujeto.

115. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-110, para usar en un método para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que lo necesita.

116. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-110, para usar en un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que lo necesita.

117. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-110, para usar en un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita.

118. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-110, para usar en un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesita.

119. Una célula que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-110.

120. La célula de la reivindicación 119, en donde el constructo de ácido nucleico se integra en un locus genómico diana, y en donde la proteína terapéutica multidominio se expresa a partir del locus genómico diana, o en donde el constructo de ácido nucleico se integra en el intrón 1 de un locus *albúmina* endógeno, y en donde la proteína terapéutica multidominio se expresa a partir del locus *albúmina* endógeno.

121. La célula de la reivindicación 119 o 120, en donde la célula es una célula hepática.

122. La célula de la reivindicación 121, en donde la célula hepática es un hepatocito.

123. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 119-122, en donde la célula es una célula humana.

124. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 119-123, en donde la célula es una célula neonatal.

125. La célula de la reivindicación 124, en donde la célula neonatal es de un sujeto neonato humano dentro de las 24 semanas después del nacimiento.

126. La célula de la reivindicación 124, en donde la célula neonatal es de un sujeto neonato humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento.

127. La célula de la reivindicación 124, en donde la célula neonatal es de un sujeto neonato humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento.

128. La célula de la reivindicación 124, en donde la célula neonatal es de un sujeto neonato humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento.

129. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 119-123, en donde la célula no es una célula neonatal.

130. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 119-129, en donde la célula es *in vivo*.

131. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 119-129, en donde la célula es *in vitro* o *ex vivo*.

132. Un método para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células, que comprende administrar a la célula o la población de células la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110, en donde opcionalmente el dominio

de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana.

133. Un método para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células, que comprende administrar a la célula o la población de células la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana.

134. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en una célula o una población de células, que comprende administrar a la célula o la población de células la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-52, en donde opcionalmente el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en la célula o población de células.

135. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células, que comprende administrar a la célula o la población de células la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110, en donde opcionalmente el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado.

136. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula o una población de células, que

comprende administrar a la célula o la población de células la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-52, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en la célula o población de células.

137. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula o una población de células, que comprende administrar a la célula o la población de células la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado.

138. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 132-137, en donde la célula es una célula hepática o la población de células es una población de células hepáticas.

139. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 132-138, en donde la célula es un hepatocito o la población de células es una población de hepatocitos.

140. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 132-139, en donde la célula es una célula humana o la población de células es una población de células humanas.

141. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 132-140, en donde la célula es una célula neonatal o la población de células es una población de células neonatales.

142. El método de la reivindicación 141, en donde la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento, opcionalmente en donde la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas posteriores al nacimiento.

143. El método de la reivindicación 141, en donde la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas posteriores al nacimiento, opcionalmente en donde la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas posteriores al nacimiento.

144. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 132-140, en donde la célula no es una célula neonatal o la población de células no es una población de células neonatales.

145. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 132-144, en donde la célula es *in vitro* o *ex vivo* o la población de células es *in vitro* o *ex vivo*.

146. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 132-144, en donde la célula es *in vivo* en un sujeto o la población de células es *in vivo* en un sujeto.

147. Un método para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula de un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110, en donde opcionalmente el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR,
en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana.

148. Un método para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende

un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula de un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana.

149. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-52, en donde opcionalmente el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en la célula.

150. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de

una cualquiera de las reivindicaciones 53-110, en donde opcionalmente el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado.

151. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-52,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en la célula.

152. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula en un sujeto, que

comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado.

153. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 149-152, en donde la proteína terapéutica multidominio expresada se administra e internaliza en el músculo esquelético y tejido cardíaco en el sujeto.

154. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 147-153, en donde la célula neonatal es una célula hepática.

155. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 147-154, en donde la célula es un hepatocito.

156. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 147-155, en donde la célula es una célula humana.

157. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 147-156, en donde la célula es una célula neonatal.

158. El método de la reivindicación 157, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento, opcionalmente en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas posteriores al nacimiento.

159. El método de la reivindicación 157, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas posteriores al nacimiento, opcionalmente en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas posteriores al nacimiento.

160. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 147-156, en donde la célula no es una célula neonatal.

161. Un método para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-52, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR.

162. Un método para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro que se une a CD63 o un dominio de suministro que se une a TfR.

163. Un método para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-52, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto.

164. Un método para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado.

165. Un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-52,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TFR.

166. Un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un

locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro que se une a CD63 o un dominio de suministro que se une a TfR.

167. Un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-52, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido.

168. Un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro que se une

a CD63 fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido.

169. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-168, en donde el sujeto tiene la enfermedad de Pompe.

170. Un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-52, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión a TFR.

171. Un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del

locus genómico diana modificado, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro que se une a CD63 o un dominio de suministro que se une a TfR.

172. Un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-52, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe.

173. Un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro que se une a CD63 fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe.

174. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 169-173, en donde la enfermedad de Pompe es la enfermedad de Pompe de aparición infantil.

175. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 169-173, en donde la enfermedad de Pompe es la enfermedad de Pompe de aparición tardía.

176. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-175, en donde el sujeto es un sujeto humano.

177. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-176, en donde el sujeto es un sujeto neonatal, opcionalmente en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento, dentro de las 12 semanas posteriores al nacimiento, dentro de las 8 semanas posteriores al nacimiento, o dentro de las 4 semanas posteriores al nacimiento.

178. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-176, en donde el sujeto no es un sujeto neonatal.

179. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-178, en donde el método resulta en un nivel terapéuticamente efectivo de la proteína terapéutica multidominio circulante o alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto.

180. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-179, en donde el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, tejido cardíaco, o tejido del sistema nervioso central en el sujeto, opcionalmente en donde el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético y tejido cardíaco en el sujeto, y opcionalmente en donde el método resulta en niveles reducidos de glucógeno en el músculo esquelético y tejido cardíaco en el sujeto comparables a niveles silvestres a la misma edad.

181. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-180, en donde el método mejora la fuerza muscular en el sujeto o previene la pérdida de fuerza muscular en el sujeto en comparación con un sujeto de control.

182. El método de la reivindicación 181, en donde el método resulta en que el sujeto tenga una fuerza muscular comparable a los niveles silvestres a la misma edad.

183. Un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-52, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto,

previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro de unión a CD63 o un dominio de suministro de unión al TfR.

184. Un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro que se une a CD63 o un dominio de suministro que se une a TfR.

185. Un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-52,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto.

186. Un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 53-110, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro que se une a CD63 fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, previniendo o reduciendo así la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto.

187. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 183-186, en donde la enfermedad de Pompe es la enfermedad de Pompe de aparición infantil.

188. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 183-186, en donde la enfermedad de Pompe es la enfermedad de Pompe de aparición tardía.

189. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 183-188, en donde el método resulta en un nivel terapéuticamente efectivo de la proteína terapéutica multidominio circulante o alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto.

190. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 183-189, en donde el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón, o tejido del sistema nervioso central del sujeto.

191. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 183-190, en donde el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético y el tejido cardíaco en el sujeto.

192. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 183-191, en donde el sujeto es un sujeto humano.

193. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 183-192, en donde el sujeto es un sujeto neonatal.

194. El método de la reivindicación 193, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento, opcionalmente en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas posteriores al nacimiento.

195. El método de la reivindicación 193, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas posteriores al nacimiento, opcionalmente en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas posteriores al nacimiento.

196. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 183-192, en donde el sujeto no es un sujeto neonatal.

197. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-196, en donde el método resulta en una mayor expresión de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la proteína terapéutica multidominio a un sujeto de control.

198. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-197, en donde el método resulta en niveles séricos aumentados de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la proteína terapéutica multidominio a un sujeto de control.

199. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-198, en donde el método resulta en niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto

de al menos aproximadamente 1 µg/ml, al menos aproximadamente 2 µg/ml, al menos aproximadamente 3 µg/ml, al menos aproximadamente 4 µg/ml, al menos aproximadamente 5 µg/ml, al menos aproximadamente 6 µg/ml, al menos aproximadamente 7 µg/ml, al menos aproximadamente 8 µg/ml, al menos aproximadamente 9 µg/ml o al menos aproximadamente 10 µg/ml.

200. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-199, en donde el método resulta en niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de al menos aproximadamente 2 µg/ml o al menos aproximadamente 5 µg/ml.

201. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-200, en donde el método resulta en niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml.

202. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-201, en donde el método resulta en niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml.

203. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-202, en donde el método logra niveles de actividad de alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente 40 % de lo normal, al menos aproximadamente 45 % de lo normal, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o 100 % de lo normal.

204. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-203, en donde:

(I) el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición infantil, y el método alcanza niveles de actividad o expresión de glucosidasa alfa lisosomal de al menos aproximadamente 1 % o más que aproximadamente 1 % de lo normal; o

(II) el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición tardía, y el método alcanza niveles de actividad o expresión de glucosidasa alfa lisosomal de al menos aproximadamente 40 % de lo normal, o más que aproximadamente 40 % de lo normal.

205. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-204, en donde la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de

la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto a las 24 semanas después de la administración.

206. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-205, en donde la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto un año después de la administración.

207. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-206, en donde la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto a las 24 semanas después de la administración.

208. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-207, en donde la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto dos años después de la administración.

209. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-208, en donde la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 60 % de la

expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto 2 años después de la administración.

210. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-209, en donde la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto a las 24 semanas después de la administración.

211. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 146-210, en donde el método comprende además evaluar la inmunidad preexistente al AAV en el sujeto antes de administrar el constructo de ácido nucleico al sujeto.

212. El método de la reivindicación 211, en donde la inmunidad preexistente al AAV es inmunidad preexistente al AAV8.

213. El método de la reivindicación 211 o 212, en donde la evaluación de la inmunidad preexistente al AAV comprende la evaluación de la inmunogenicidad mediante el uso de un ensayo inmunitario de anticuerpos totales o un ensayo de anticuerpos neutralizantes.

214. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 132-213, en donde el constructo de ácido nucleico se administra simultáneamente con el agente de

nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

215. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 132-213, en donde el constructo de ácido nucleico no se administra simultáneamente con el agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

216. El método de la reivindicación 215, en donde el constructo de ácido nucleico se administra antes que el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

217. El método de la reivindicación 215, en donde el constructo de ácido nucleico se administra después del agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

218. Una composición que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a TfR fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal, en donde la secuencia codificante de la glucosidasa alfa lisosomal carece de CpG en relación con una secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal silvestre.

219. La composición de la reivindicación 218, en donde el dominio de suministro de unión al TfR se fusiona con

la proteína alfa glucosidasa lisosomal a través de un enlazador peptídico.

220. La composición de la reivindicación 218 o 219, en donde la alfa glucosidasa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la alfa glucosidasa lisosomal.

221. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-220, en donde la alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

222. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-221, en donde la alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

223. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-222, en donde la secuencia codificante de alfa glucosidasa lisosomal se optimiza por codones y carece de CpG.

224. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-223, en donde la secuencia codificante de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 176.

225. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-224, en donde la secuencia codificante de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212 y codifica una proteína glucosidasa alfa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173.

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 176 y codifica una proteína alfa-glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident. 173.

226. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-225, en donde la secuencia codificante de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al

menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, está optimizada por codones o carece de CpG, y codifica una proteína glucosidasa alfa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 176, tiene los codones optimizados y agotada en CpG, y codifica una proteína alfa-glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident. 173.

227. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-226, en donde la secuencia codificante de alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 176.

228. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-227, en donde la secuencia codificante de alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia

expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 176.

229. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-228, en donde la secuencia codificante para el dominio de suministro de unión al TfR se optimiza por codones o carece de CpG.

230. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-229, en donde la secuencia codificante para el dominio de suministro de unión al TfR se optimiza por codones y carece de CpG.

231. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-230, en donde el dominio de suministro de unión al TfR comprende una proteína de unión al antígeno anti-TfR.

232. La composición de la reivindicación 231, en donde la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende:

- (i) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377,

387, 397, 407, 417, 427, 437, 447, 457, 467, 477, 487, 497, 507, 517 o 527 (o una variante de estas); y/o

(ii) una LCVR que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 382, 392, 402, 412, 422, 432, 442, 452, 462, 472, 482, 492, 502, 512, 522 o 532 (o una variante de estas).

233. La composición de la reivindicación 231 o 232, en donde la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende:

- (1) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 217 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 222 (o una variante de esta);
- (2) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 227 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la

LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 232 (o una variante de esta);

(3) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 237 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 242 (o una variante de esta);

(4) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 247 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 252 (o una variante de esta);

(5) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 257 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 262 (o una variante de esta);

- (6) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 267 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 272 (o una variante de esta);
- (7) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 277 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 282 (o una variante de esta);
- (8) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 287 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 292 (o una variante de esta);
- (9) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 297 (o una

variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 302 (o una variante de esta);

(10) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 307 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 312 (o una variante de esta);

(11) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 317 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 322 (o una variante de esta);

(12) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 327 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con
núm. de ident.: 332 (o una variante de esta);

(13) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una
HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos
expuesta en la sec. con núm. de ident.: 337 (o una
variante de esta); y una LCVR que comprende la
LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la
secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con
núm. de ident.: 342 (o una variante de esta);

(14) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una
HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos
expuesta en la sec. con núm. de ident.: 347 (o una
variante de esta); y una LCVR que comprende la
LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la
secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con
núm. de ident.: 352 (o una variante de esta);

(15) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una
HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos
expuesta en la sec. con núm. de ident.: 357 (o una
variante de esta); y una LCVR que comprende la
LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la
secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con
núm. de ident.: 362 (o una variante de esta);

- (16) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 367 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 372 (o una variante de esta);
- (17) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 377 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 382 (o una variante de esta);
- (18) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 387 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 392 (o una variante de esta);
- (19) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 397 (o una

variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 402 (o una variante de esta);

(20) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 407 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 412 (o una variante de esta);

(21) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 417 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 422 (o una variante de esta);

(22) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 427 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con
núm. de ident.: 432 (o una variante de esta);

(23) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de
una HCVR que comprende la secuencia de
aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de
ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR
que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR
que comprende la secuencia de aminoácidos
establecida en la sec. con núm. de ident.: 442
(o una variante de esta);

(24) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una
HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos
expuesta en la sec. con núm. de ident.: 447 (o una
variante de esta); y una LCVR que comprende la
LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la
secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con
núm. de ident.: 452 (o una variante de esta);

(25) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una
HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos
expuesta en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una
variante de esta); y una LCVR que comprende la
LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la
secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con
núm. de ident.: 462 (o una variante de esta);

- (26) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 467 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 472 (o una variante de esta);
- (27) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 477 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 482 (o una variante de esta);
- (28) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 487 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 492 (o una variante de esta);
- (29) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 497 (o una

variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 502 (o una variante de esta);

(30) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 507 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 512 (o una variante de esta);

(31) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 517 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 522 (o una variante de esta); o

(32) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 527 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR que comprende la

secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con
núm. de ident.: 532 (o una variante de esta).

234. La composición de una cualquiera de las
reivindicaciones 231-233, en donde la proteína de unión al
antígeno anti-TfR comprende:

- (1) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de
una HCVR que comprende la secuencia de
aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de
ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR
que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR
que comprende la secuencia de aminoácidos
establecida en la sec. con núm. de ident.: 442
(o una variante de esta); o
- (2) una HCVR que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de
una HCVR que comprende la secuencia de
aminoácidos establecida en la sec. con núm. de
ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR
que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de una LCVR
que comprende la secuencia de aminoácidos
establecida en la sec. con núm. de ident.: 462
(o una variante de esta).

235. La composición de una cualquiera de las
reivindicaciones 231-234, en donde la proteína de unión al
antígeno anti-TfR comprende:

- (a) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 218 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 219 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 220 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 223 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 224 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 225 (o una variante de esta);
- (b) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 228 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 229 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 230 (o una variante de esta); y

una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 233 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 234 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 235 (o una variante de esta);

- (c) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 238 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 239 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 240 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 243 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 244 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 245 (o una variante de esta);

(d) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 248 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 249 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 250 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 253 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 254 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 255 (o una variante de esta);

(e) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 258 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de

ident.: 259 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 260 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 263 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 264 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 265 (o una variante de esta);

- (f) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 268 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 269 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 270 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 273 (o una variante de esta), una LCDR2

que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 274 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 275 (o una variante de esta);

- (g) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 278 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 279 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 280 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 283 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 284 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 285 (o una variante de esta);
- (h) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec.

con núm. de ident.: 288 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 289 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 290 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 293 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 294 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 295 (o una variante de esta);

- (i) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 298 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 299 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 300 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende:

una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 303 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 304 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 305 (o una variante de esta);

- (j) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 308 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 309 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 310 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 313 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 314 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 315 (o una variante de esta);

(k) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 318 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 319 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 320 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 323 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 324 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 325 (o una variante de esta);

(l) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 328 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de

ident.: 329 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 330 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 333 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 334 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 335 (o una variante de esta);

- (m) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 338 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 339 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 340 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 343 (o una variante de esta), una LCDR2

que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 344 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 345 (o una variante de esta);

- (n) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 348 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 349 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 350 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 353 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 354 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 355 (o una variante de esta);
- (o) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec.

con núm. de ident.: 358 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 359 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 360 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 363 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 364 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 365 (o una variante de esta);

- (p) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 368 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 369 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 370 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende:

una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 373 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 374 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 375 (o una variante de esta);

- (q) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 378 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 379 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 380 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 383 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 384 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 385 (o una variante de esta);

(r) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 388 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 389 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 390 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 393 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 394 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 395 (o una variante de esta);

(s) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 398 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de

ident.: 399 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 400 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 403 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 404 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 405 (o una variante de esta);

- (t) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 408 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 409 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 410 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 413 (o una variante de esta), una LCDR2

que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 414 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 415 (o una variante de esta);

- (u) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 418 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 419 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 420 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 423 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 424 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 425 (o una variante de esta);
- (v) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec.

con núm. de ident.: 428 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 429 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 430 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 433 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 434 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 435 (o una variante de esta);

- (w) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 438 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 439 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 440 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende:

una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 443 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 444 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 445 (o una variante de esta);

(x) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 448 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 449 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 450 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 453 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 454 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 455 (o una variante de esta);

(y) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 458 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 459 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 460 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 463 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 464 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 465 (o una variante de esta);

(z) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 468 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de

ident.: 469 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 470 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 473 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 474 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 475 (o una variante de esta);

(aa) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 478 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 479 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 480 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 483 (o una variante de esta), una LCDR2

que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 484 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 485 (o una variante de esta);

(ab) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 488 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 489 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 490 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 493 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 494 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 495 (o una variante de esta);

(ac) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec.

con núm. de ident.: 498 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 499 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 500 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 503 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 504 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 505 (o una variante de esta);

(ad) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 508 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 509 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 510 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende:

una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 513 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 514 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 515 (o una variante de esta);

(ae) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 518 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 519 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 520 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 523 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 524 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de

aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 525 (o una variante de esta); y/o

(af) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 528 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 529 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 530 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 533 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 534 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 535 (o una variante de esta).

236. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 231-235, en donde la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende:

(a) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec.

con núm. de ident.: 438 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 439 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 440 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende: una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 443 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 444 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 445 (o una variante de esta); o

- (b) una HCVR que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 458 (o una variante de esta), una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 459 (o una variante de esta) y una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 460 (o

una variante de esta); y una LCVR que comprende:
una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 463 (o una variante de esta), una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 464 (o una variante de esta) y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 465 (o una variante de esta).

237. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 231-236, en donde la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende:

- (i) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 217 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 222 (o una variante de esta);
- (ii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 227 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 232 (o una variante de esta);

- (iii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 237 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 242 (o una variante de esta);
- (iv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 247 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 252 (o una variante de esta);
- (v) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 257 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 262 (o una variante de esta);
- (vi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 267 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 272 (o una variante de esta);

- (vii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 277 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 282 (o una variante de esta);
- (viii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 287 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 292 (o una variante de esta);
- (ix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 297 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 302 (o una variante de esta);
- (x) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 307 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 312 (o una variante de esta);

- (xi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 317 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 322 (o una variante de esta);
- (xii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 327 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 332 (o una variante de esta);
- (xiii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 337 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 342 (o una variante de esta);
- (xiv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 347 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 352 (o una variante de esta);

- (xv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 357 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 362 (o una variante de esta);
- (xvi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 367 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 372 (o una variante de esta);
- (xvii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 377 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 382 (o una variante de esta);
- (xviii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 387 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 392 (o una variante de esta);

- (xix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 397 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 402 (o una variante de esta);
- (xx) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 407 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 412 (o una variante de esta);
- (xxi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 417 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 422 (o una variante de esta);
- (xxii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 427 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 432 (o una variante de esta);

(xxiii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta);

(xxiv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 447 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 452 (o una variante de esta);

(xxv) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta);

(xxvi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 467 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 472 (o una variante de esta);

(xxvii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 477 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 482 (o una variante de esta);

(xxviii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 487 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 492 (o una variante de esta);

(xxix) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 497 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 502 (o una variante de esta);

(xxx) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 507 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 512 (o una variante de esta);

(xxxi) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 517 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 522 (o una variante de esta); y/o

(xxxii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 527 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 532 (o una variante de esta).

238. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 231-237, en donde la proteína de unión al antígeno anti-TfR comprende:

(i) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 437 (o una variante de esta); y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 442 (o una variante de esta); o

(ii) una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 457 (o una variante de esta); y una LCVR

que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 462 (o una variante de esta).

239. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-238, en donde el dominio de suministro de unión al TfR comprende un anticuerpo anti-TfR, un fragmento de anticuerpo o un fragmento variable monocatenario (scFv).

240. La composición de la reivindicación 239, en donde el dominio de suministro de unión al TfR es el fragmento variable monocatenario (scFv), opcionalmente en donde la proteína terapéutica multidominio comprende dominios dispuestos en la siguiente orientación: N'-región variable de cadena pesada-región variable de cadena ligera-glucosidasa alfa lisosomal-C' o N'-región variable de cadena ligera-región variable de cadena pesada-glucosidasa alfa lisosomal-C', opcionalmente en donde el scFv y la glucosidasa alfa lisosomal se conectan por un enlazador peptídico, y opcionalmente en donde el enlazador peptídico que es $-(GGGS)_m-$ (sec. con núm. de ident.: 600); en donde m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, opcionalmente en donde las regiones variables de scFv se conectan por un enlazador peptídico, y opcionalmente en donde el enlazador peptídico que es $-(GGGS)_m-$ (sec. con núm. de ident.: 600); en donde m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10.

241. La composición de la reivindicación 240, en donde la proteína terapéutica multidominio comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena ligera (V_L) y una alfa glucosidasa lisosomal, en donde la V_H , V_L y la alfa glucosidasa lisosomal se organizan de la siguiente manera:

- (i) V_L - V_H -glucosidasa alfa lisosomal;
- (ii) V_H - V_L -glucosidasa alfa lisosomal;
- (iii) V_L -[(GGGS)₃]- V_H -[(GGGS)₂]-glucosidasa alfa lisosomal; o
- (iv) V_H -[(GGGS)₃]- V_L -[(GGGS)₂]-glucosidasa alfa lisosomal.

242. La composición de la reivindicación 240 o 241, en donde el scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 540, 549, 551, y 554, opcionalmente en donde el scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 554.

243. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 240-242, en donde el scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 540, 549, 551, y 554, opcionalmente en donde el scFv consiste en la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 554.

244. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-243, en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 587-599,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593.

245. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-244, en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 587-599 y codifica un scFv que comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 540, 549, 551, y 554,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 593 y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554.

246. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-245, en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 587-599, está optimizada por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 540, 549, 551, y 554,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al

menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595, se optimiza por codones y carece de CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident.: 554,

opcionalmente en donde la secuencia codificante del scFv es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 593, la secuencia codificante del scFv tiene los codones optimizados y agotada en CpG, y codifica un scFv que comprende la sec. con núm. de ident. 554.

247. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-246, en donde la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 587-599,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 593.

248. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-247, en donde la secuencia codificante de

scFv consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 587-599, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv consiste en la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 593-595, opcionalmente en donde la secuencia codificante de scFv consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 593.

249. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-248, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones o carece de CpG.

250. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-249, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se optimiza por codones y carece de CpG.

251. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-250, en donde la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 570-573, opcionalmente en donde la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 573.

252. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-251, en donde la proteína terapéutica

multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 570-573, opcionalmente en donde la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 573.

253. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-252, en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586,

opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 584,

opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 733.

254. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-253, en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 570-573,

opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al

menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 584, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 573,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 733, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 573.

255. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-254, en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586 y está optimizada por codones y carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 570-573, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos

99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586 y se optimiza por codones o carece de CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 573,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 584, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio tiene los codones optimizados y agotada en CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 573,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 733, la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio tiene los codones optimizados y agotada en CpG, y la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 573.

256. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-255, en donde la secuencia codificante

para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586,

opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584,

opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 733.

257. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-256, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586,

opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584,

opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 733.

258. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-257, en donde el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio.

259. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-258, en donde el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio.

260. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-259, en donde el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio, y el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio.

261. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-260, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología.

262. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-260, en donde el constructo de ácido nucleico comprende brazos de homología.

263. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-262, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio.

264. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 218-262, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor, opcionalmente en donde el promotor es un promotor específico del hígado.

265. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 218-264, en donde el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario o ADN bicatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario.

266. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-265, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación,

en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 733, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio, y en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología.

267. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-266, en donde el constructo de ácido

nucleico se encuentra en un vector de ácido nucleico o una nanopartícula lipídica.

268. La composición de la reivindicación 267, en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en el vector de ácido nucleico.

269. La composición de la reivindicación 268, en donde el vector de ácido nucleico es un vector viral.

270. La composición de la reivindicación 267 o 268, en donde el vector de ácido nucleico es un vector viral adenoasociado (AAV), opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

271. La composición de la reivindicación 270, en donde el vector AAV es un vector AAV monocatenario (ssAAV).

272. La composición de la reivindicación 270 o 271, en donde el vector AAV se deriva de un vector AAV8, un vector AAV3B, un vector AAV5, un vector AAV6, un vector AAV7, un vector AAV9, un vector AAVrh.74, o un vector AAVhu.37.

273. La composición de la reivindicación 272, en donde el vector AAV es un vector AAV8 recombinante (rAAV8).

274. La composición de la reivindicación 273, en donde el vector AAV es un vector rAAV8 monocatenario.

275. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-274, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el

constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 733,
en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio,
en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y
en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

276. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-275, en donde el constructo de ácido nucleico carece de CpG.

277. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-276, que comprende además un agente de nucleasa que se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana.

278. La composición de la reivindicación 277, en donde el locus genómico diana es un gen de *albúmina*, opcionalmente en donde el gen de *albúmina* es un gen de *albúmina* humano.

279. La composición de la reivindicación 278, en donde el sitio diana de la nucleasa se encuentra en el intrón 1 del gen *albúmina*.

280. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 277-279, en donde el agente nucleasa comprende:

- (a) una nucleasa con dedos de zinc (ZFN);
- (b) una nucleasa efectora similar al activador de la transcripción (TALEN); o
- (c) (i) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y
(ii) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas para la secuencia diana del ARN guía.

281. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 277-279, en donde el agente nucleasa comprende:

- (a) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y

(b) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas para la secuencia diana del ARN guía.

282. La composición de la reivindicación 281, en donde la secuencia diana del ARN guía se encuentra en el intrón 1 de un gen *albúmina*.

283. La composición de la reivindicación 282, en donde el gen *albúmina* es un gen *albúmina* humano.

284. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-283, en donde:

- (I) el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19, o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41; y/o
- (II) el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia

establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41.

285. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-284, en donde el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41.

286. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-285, en donde el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41.

287. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-286, en donde el ARN guía comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 62-125, opcionalmente en donde el ARN guía comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, y 105.

288. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-287, en donde:

(I) el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19, o al menos 20 nucleótidos contiguos de la sec. con núm. de ident.: 36; y/o

(II) el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 36.

289. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-288, en donde el segmento dirigido al ADN comprende la sec. con núm. de ident.: 36.

290. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-289, en donde el segmento dirigido al ADN consiste en la sec. con núm. de ident.: 36.

291. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 68-290, en donde el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100.

292. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-291, en donde el ARN guía se encuentra en la forma de ARN.

293. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-292, en donde el ARN guía comprende al menos una modificación.

294. La composición de la reivindicación 293, en donde al menos una modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metilo.

295. La composición de la reivindicación 293 o 294, en donde al menos una modificación comprende una unión de fosforotioato entre nucleótidos.

296. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 293-295, en donde al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los primeros cinco nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

297. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 293-296, en donde al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

298. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 293-297, en donde al menos una modificación comprende uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

299. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 293-298, en donde al menos una modificación comprende uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

300. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 293-299, en donde al menos una modificación

comprende nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

301. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 293-300, en donde al menos una modificación comprende nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

302. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 293-301, en donde al menos una modificación comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

303. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-302, en donde el ARN guía es un ARN guía único (ARNsg).

304. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-303, en donde el ARN guía en la forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro

nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

305. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-304, en donde la proteína Cas es una proteína Cas9.

306. La composición de la reivindicación 305, en donde la proteína Cas9 se deriva de una proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, una proteína Cas9 de *Staphylococcus aureus*, una proteína Cas9 de *Campylobacter jejuni*, una proteína Cas9 de *Streptococcus thermophilus*, o una proteína Cas9 de *Neisseria meningitidis*.

307. La composición de la reivindicación 305, en donde la proteína Cas se deriva de una proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes*.

308. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-307, en donde la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 11.

309. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-308, en donde el ácido nucleico que codifica la proteína Cas se optimiza por codones para la expresión en una célula de mamífero o una célula humana.

310. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-309, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas.

311. La composición de la reivindicación 310, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas comprende al menos una modificación.

312. La composición de la reivindicación 310 o 311, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas se modifica para comprender una uridina modificada en una o más o en todas las posiciones de uridina.

313. La composición de la reivindicación 312, en donde la uridina modificada es pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina.

314. La composición de la reivindicación 312 o 313, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye totalmente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina.

315. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 310-314, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas comprende una caperuza en 5'.

316. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 310-315, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas comprende una secuencia de poliadenilación.

317. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 310-316, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núms. de ident.: 226, 225, o 12.

318. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-317, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núms. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye totalmente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación.

319. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-318, en donde el ARN guía en la forma de ARN y el ARN guía comprenden la sec. con núm. de ident.: 68 o 100, y

en donde la composición comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225, o 12.

320. La composición de la reivindicación 319, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio, y una señal o secuencia de poliadenilación,

en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 733,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y

en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

321. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-318, en donde el ARN guía en la forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía, y

en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende

un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 226, 225, o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye totalmente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación.

322. La composición de la reivindicación 321, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio, y una señal o secuencia de poliadenilación,

en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína

terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 733,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y

en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

323. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-322, en donde la proteína Cas o el ácido nucleico que codifica la proteína Cas y el ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía se asocian con una nanopartícula lipídica.

324. La composición de la reivindicación 323, en donde la nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico, un lípido neutro, un lípido auxiliar, y un lípido sigiloso.

325. La composición de la reivindicación 324, en donde el lípido catiónico es el Lípido A ((9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato).

326. La composición de la reivindicación 324 o 325, en donde el lípido neutro es diestearoilfosfatidilcolina o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC).

327. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 324-326, en donde el lípido auxiliar es el colesterol.

328. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 324-327, en donde el lípido sigiloso es 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metoxipoli-etilenglicol-2000 (PEG2k-DMG).

329. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 324-328, en donde el lípido catiónico es el Lípido A, el lípido neutro es DSPC, el lípido auxiliar es colesterol y el lípido sigiloso es PEG2k-DMG.

330. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 323-329, en donde la nanopartícula lipídica

comprende cuatro lípidos en las siguientes relaciones molares: aproximadamente 50 % mol de Lípido A, aproximadamente 9 % mol de DSPC, aproximadamente 38 % mol de colesterol, y aproximadamente 3 % mol de PEG2k-DMG.

331. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-330, en donde el gen *albúmina* es un gen de *albúmina* humano,

en donde el ARN guía está en forma de ARN, y el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100,

en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225, o 12, y

en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende Lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente 50 mol % de Lípido A, aproximadamente 9 mol % de DSPC, aproximadamente 38 mol % de colesterol, y aproximadamente 3 mol % de PEG2k-DMG.

332. La composición de la reivindicación 331, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante para la proteína

terapéutica multidominio, y una señal o secuencia de poliadenilación,

en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 733,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y

en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

333. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 281-330, en donde el gen *albúmina* es un gen de *albúmina* humano,

en donde el ARN guía en la forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía,

en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína

Cas comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 226, 225, o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye totalmente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación, y en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende Lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente 50 mol % de Lípido A, aproximadamente 9 mol % de DSPC, aproximadamente 38 mol % de colesterol, y aproximadamente 3 mol % de PEG2k-DMG.

334. La composición de la reivindicación 333, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio, y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 176, opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 574-586, y

opcionalmente en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 584-586, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la proteína terapéutica multidominio comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 584, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 733, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la proteína terapéutica multidominio, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

335. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-334, para usar en un método para insertar

el ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica multidominio en un locus genómico diana en una célula o una población de células.

336. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-334, para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio de un locus genómico diana en una célula o una población de células o para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células.

337. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-334, para usar en un método para insertar el ácido nucleico que codifica la proteína terapéutica multidominio en un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto.

338. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-334, para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio de un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto o para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células en un sujeto.

339. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-334, para usar en un método para tratar

una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que lo necesita.

340. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-334, para usar en un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que lo necesita.

341. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-334, para usar en un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita.

342. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-334, para usar en un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesita.

343. Una célula que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-334.

344. La célula de la reivindicación 343, en donde el constructo de ácido nucleico se integra en un locus genómico diana, y en donde la proteína terapéutica multidominio se expresa a partir del locus genómico diana, o en donde el constructo de ácido nucleico se integra en el intrón 1 de un locus *albúmina* endógeno, y en donde la proteína terapéutica multidominio se expresa a partir del locus *albúmina* endógeno.

345. La célula de la reivindicación 343 o 344, en donde la célula es una célula hepática.

346. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 343-345, en donde la célula hepática es un hepatocito.

347. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 343-346, en donde la célula es una célula humana.

348. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 343-347, en donde la célula es una célula neonatal.

349. La célula de la reivindicación 348, en donde la célula neonatal es de un sujeto neonato humano dentro de las 24 semanas después del nacimiento.

350. La célula de la reivindicación 348, en donde la célula neonatal es de un sujeto neonato humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento.

351. La célula de la reivindicación 348, en donde la célula neonatal es de un sujeto neonato humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento.

352. La célula de la reivindicación 348, en donde la célula neonatal es de un sujeto neonato humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento.

353. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 343-347, en donde la célula no es una célula neonatal.

354. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 343-353, en donde la célula es *in vivo*.

355. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 343-353, en donde la célula es *in vitro* o *ex vivo*.

356. Un método para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células, que comprende administrar a la célula o la población de células la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 277-334, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana.

357. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula o una población de células, que comprende administrar a la célula o la población de células la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-276, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el

constructo de ácido nucleico y se expresa en la célula o población de células.

358. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal de un locus genómico diana en una célula o una población de células, que comprende administrar a la célula o la población de células la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 277-334,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro que se une a TfR fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado.

359. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 356-358, en donde la célula es una célula hepática o la población de células es una población de células hepáticas, opcionalmente en donde la célula es un hepatocito o la población de células es una población de hepatocitos.

360. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 356-359, en donde la célula es una célula

humana o la población de células es una población de células humanas.

361. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 356-360, en donde la célula es una célula neonatal o la población de células es una población de células neonatales.

362. El método de la reivindicación 361, en donde la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 24 semanas después del nacimiento.

363. El método de la reivindicación 361, en donde la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento.

364. El método de la reivindicación 361, en donde la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento.

365. El método de la reivindicación 361, en donde la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento.

366. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 356-360, en donde la célula no es una célula

neonatal o la población de células no es una población de células neonatales.

367. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 356-366, en donde la célula es *in vitro* o *ex vivo* o la población de células es *in vitro* o *ex vivo*.

368. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 356-366, en donde la célula es *in vivo* en un sujeto o la población de células es *in vivo* en un sujeto.

369. Un método para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal en un locus genómico diana en una célula de un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 277-334,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana.

370. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una proteína alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-276,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en la célula.

371. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión al TfR fusionado con una proteína glucosidasa alfa lisosomal de un locus genómico diana en una célula en un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 277-334,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro que se une a TfR fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado.

372. El método de la reivindicación 370, en donde la proteína terapéutica multidominio expresada se suministra e internaliza en el músculo esquelético, corazón, y tejido del sistema nervioso central del sujeto.

373. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 369-372, en donde la célula es un hepatocito o la población de células es una población de hepatocitos.

374. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 369-373, en donde la célula es una célula humana.

375. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 369-374, en donde la célula es una célula neonatal.

376. El método de la reivindicación 375, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 24 semanas después del nacimiento.

377. El método de la reivindicación 375, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento.

378. El método de la reivindicación 375, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento.

379. El método de la reivindicación 375, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento.

380. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 369-374, en donde la célula no es una célula neonatal.

381. Un método para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que lo necesita, que comprende

administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-276,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto.

382. Un método para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 277-334,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro que se une a TfR fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado.

383. Un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-276,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido.

384. Un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 277-334,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro que se une a TfR fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido.

385. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-384, en donde el sujeto tiene la enfermedad de Pompe.

386. Un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-276,

en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe.

387. Un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 277-334,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro que se une a TfR fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe.

388. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 385-387, en donde la enfermedad de Pompe es la enfermedad de Pompe de aparición infantil.

389. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 385-387, en donde la enfermedad de Pompe es la enfermedad de Pompe de aparición tardía.

390. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-389, en donde el sujeto es un sujeto humano.

391. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-390, en donde el sujeto es un sujeto neonatal.

392. El método de la reivindicación 391, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento, opcionalmente en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas posteriores al nacimiento, dentro de las 8 semanas posteriores al nacimiento, o dentro de las 4 semanas posteriores al nacimiento.

393. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-390, en donde el sujeto no es un sujeto neonatal.

394. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-393, en donde el método resulta en un nivel terapéuticamente efectivo de la proteína terapéutica multidominio circulante o alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto.

395. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-394, en donde el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón o tejido del sistema nervioso central del sujeto.

396. El método de la reivindicación 395, en donde el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón y tejido del sistema nervioso central del sujeto.

397. El método de la reivindicación 396, en donde el método resulta en niveles reducidos de glucógeno en el músculo esquelético, corazón y tejido del sistema nervioso central del sujeto comparable a los niveles silvestres a la misma edad.

398. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-397, en donde el método mejora la fuerza muscular en el sujeto o previene la pérdida de fuerza muscular en el sujeto en comparación con un sujeto de control.

399. El método de la reivindicación 398, en donde el método resulta en que el sujeto tenga una fuerza muscular comparable a los niveles silvestres a la misma edad.

400. Un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesita, que comprende administrar al sujeto neonatal la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 218-276, en donde la secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto.

401. Un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto

neonatal que lo necesita, que comprende administrar al sujeto neonatal la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 277-334,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro que se une a TfR fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, previniendo o reduciendo así la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto.

402. El método de la reivindicación 400 o 401, en donde la enfermedad de Pompe es la enfermedad de Pompe de aparición infantil.

403. El método de la reivindicación 400 o 401, en donde la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de aparición tardía.

404. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 400-403, en donde el método resulta en un nivel terapéuticamente efectivo de la proteína terapéutica multidominio circulante o alfa glucosidasa lisosomal en el sujeto.

405. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 400-404, en donde el método previene o reduce

la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón, o tejido del sistema nervioso central del sujeto.

406. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 400-405, en donde el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón, y tejido del sistema nervioso central del sujeto.

407. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 400-406, en donde el sujeto es un sujeto humano.

408. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 400-407, en donde el sujeto es un sujeto neonatal.

409. El método de la reivindicación 408, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento, opcionalmente en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas posteriores al nacimiento.

410. El método de la reivindicación 408, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento.

411. El método de la reivindicación 408, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento.

412. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-407, en donde el sujeto no es un sujeto neonatal.

413. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-412, en donde el método resulta en una mayor expresión de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la proteína terapéutica multidominio a un sujeto de control.

414. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-413, en donde el método resulta en niveles séricos aumentados de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la proteína terapéutica multidominio a un sujeto de control.

415. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-414, en donde el método resulta en niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de al menos aproximadamente 1 µg/ml, al menos aproximadamente 2 µg/ml, al menos aproximadamente 3 µg/ml, al menos aproximadamente 4 µg/ml, al menos aproximadamente 5 µg/ml, al menos aproximadamente 6 µg/ml, al menos aproximadamente

7 µg/ml, al menos aproximadamente 8 µg/ml, al menos aproximadamente 9 µg/ml o al menos aproximadamente 10 µg/ml.

416. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-415, en donde el método resulta en niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de al menos aproximadamente 2 µg/ml o al menos aproximadamente 5 µg/ml.

417. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-416, en donde el método resulta en niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml.

418. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-417, en donde el método resulta en niveles séricos de la proteína terapéutica multidominio en el sujeto de entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml.

419. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-418, en donde el método logra niveles de actividad de alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente 40 % de lo normal, al menos aproximadamente 45 % de lo normal, al menos aproximadamente 50 %, al menos

aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o 100 % de lo normal.

420. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-419, en donde:

(I) el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición infantil, y el método alcanza niveles de actividad o expresión de glucosidasa alfa lisosomal de al menos aproximadamente 1 % o más que aproximadamente 1 % de lo normal; o

(II) el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición tardía, y el método alcanza niveles de actividad o expresión de glucosidasa alfa lisosomal de al menos aproximadamente 40 % de lo normal, o más que aproximadamente 40 % de lo normal.

421. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-420, en donde la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto a las 24 semanas después de la administración.

422. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-421, en donde la expresión o actividad de

la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto un año después de la administración.

423. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-422, en donde la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto a las 24 semanas después de la administración.

424. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-423, en donde la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 50 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto dos años después de la administración.

425. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-424, en donde la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio es al menos 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto 2 años después de la administración.

426. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-425, en donde la expresión o actividad

de la proteína terapéutica multidominio es al menos 60 % de la expresión o actividad de la proteína terapéutica multidominio en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto a las 24 semanas después de la administración.

427. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 368-426, en donde el método comprende además evaluar la inmunidad preexistente al AAV en el sujeto antes de administrar el constructo de ácido nucleico al sujeto.

428. El método de la reivindicación 427, en donde la inmunidad preexistente al AAV es inmunidad preexistente al AAV8.

429. El método de la reivindicación 427 o 428, en donde la evaluación de la inmunidad preexistente al AAV comprende la evaluación de la inmunogenicidad mediante el uso de un ensayo inmunitario de anticuerpos totales o un ensayo de anticuerpos neutralizantes.

430. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 356-429, en donde el constructo de ácido nucleico se administra simultáneamente con el agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

431. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 356-429, en donde el constructo de ácido nucleico no se administra simultáneamente con el agente de

nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

432. El método de la reivindicación 431, en donde el constructo de ácido nucleico se administra antes que el agente de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

433. El método de la reivindicación 431, en donde el constructo de ácido nucleico se administra después del agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

434. Una composición que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la glucosidasa alfa lisosomal, en donde la secuencia codificante de la glucosidasa alfa lisosomal carece de CpG con respecto a una secuencia codificante de la glucosidasa alfa lisosomal silvestre.

435. La composición de la reivindicación 434, en donde la glucosidasa alfa lisosomal carece del péptido y propéptido señal de la glucosidasa alfa lisosomal.

436. La composición de la reivindicación 434 o 435, en donde la glucosidasa alfa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 173.

437. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-436, en donde la alfa glucosidasa lisosomal

consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.:
173.

438. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-437, en donde la secuencia codificante de alfa glucosidasa lisosomal se optimiza por codones o carece de CpG.

439. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-438, en donde la secuencia codificante de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 176.

440. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-439, en donde la secuencia codificante de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.:

174-182 y 205-212 y codifica una proteína glucosidasa alfa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173.

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 176 y codifica una proteína alfa-glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident. 173.

441. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-440, en donde la secuencia codificante de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, está optimizada por codones o carece de CpG, y codifica una proteína glucosidasa alfa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident.: 173,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal es al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 176, tiene los codones optimizados y agotada en CpG, y codifica una proteína alfa-

glucosidasa lisosomal que comprende la sec. con núm. de ident. 173.

442. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-441, en donde la secuencia codificante de alfa glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 176.

443. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-442, en donde la secuencia codificante de alfa glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212,

opcionalmente en donde la secuencia codificante de la alfa-glucosidasa lisosomal consiste en la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident. 176.

444. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-443, en donde el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal.

445. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-444, en donde el constructo de ácido

nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal.

446. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-445, en donde el constructo de ácido nucleico comprende un aceptor de empalme corriente arriba de la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal, y el constructo de ácido nucleico comprende una señal o secuencia de poliadenilación corriente abajo de la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal.

447. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-446, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología.

448. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-446, en donde el constructo de ácido nucleico comprende brazos de homología.

449. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-448, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que dirige la expresión de la glucosidasa alfa lisosomal.

450. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-448, en donde la secuencia codificante de alfa glucosidasa lisosomal se une operativamente a un promotor,

opcionalmente en donde el promotor es un promotor específico del hígado.

451. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-450, en donde el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario o ADN bicatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico es ADN monocatenario.

452. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-451, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal, y una señal o secuencia de poliadenilación,

en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la sec. con núm. de ident.: 176,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la glucosidasa alfa lisosomal, y en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología.

453. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-452, en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector de ácido nucleico o una nanopartícula lipídica.

454. La composición de la reivindicación 453, en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en el vector de ácido nucleico.

455. La composición de la reivindicación 454, en donde el vector de ácido nucleico es un vector viral.

456. La composición de la reivindicación 453 o 454, en donde el vector de ácido nucleico es un vector viral adenoasociado (AAV),
opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

457. La composición de la reivindicación 456, en donde el vector AAV es un vector AAV monocatenario (ssAAV).

458. La composición de la reivindicación 456 o 457, en donde el vector AAV se deriva de un vector AAV8, un vector AAV3B, un vector AAV5, un vector AAV6, un vector AAV7, un vector AAV9, un vector AAVrh.74, o un vector AAVhu.37.

459. La composición de la reivindicación 458, en donde el vector AAV es un vector AAV8 recombinante (rAAV8).

460. La composición de la reivindicación 459, en donde el vector AAV es un vector rAAV8 monocatenario.

461. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-460, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal, y una señal o secuencia de poliadenilación,

en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la sec. con núm. de ident.: 176,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la glucosidasa alfa lisosomal,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y

en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo

comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

462. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-461, en donde el constructo de ácido nucleico carece de CpG.

463. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-462, que comprende además un agente de nucleasa que se dirige a un sitio diana de nucleasa en un locus genómico diana.

464. La composición de la reivindicación 463, en donde el locus genómico diana es un gen de *albúmina*, opcionalmente en donde el gen de *albúmina* es un gen de *albúmina* humano.

465. La composición de la reivindicación 464, en donde el sitio diana de la nucleasa se encuentra en el intrón 1 del gen *albúmina*.

466. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 463-465, en donde el agente nucleasa comprende:

- (a) una nucleasa con dedos de zinc (ZFN);
- (b) una nucleasa efectora similar al activador de la transcripción (TALEN); o
- (c) (i) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y
(ii) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía comprende

un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas para la secuencia diana del ARN guía.

467. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 463-465, en donde el agente nucleasa comprende:

- (a) una proteína Cas o un ácido nucleico que codifica la proteína Cas; y
- (b) un ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía, en donde el ARN guía comprende un segmento dirigido al ADN que se dirige a una secuencia diana del ARN guía, y en donde el ARN guía se une a la proteína Cas y se dirige a la proteína Cas para la secuencia diana del ARN guía.

468. La composición de la reivindicación 467, en donde la secuencia diana del ARN guía se encuentra en el intrón 1 de un gen *albúmina*.

469. La composición de la reivindicación 468, en donde el gen *albúmina* es un gen *albúmina* humano.

470. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-469, en donde:

- (I) el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19, o al menos 20 nucleótidos

contiguos de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41; y/o

(II) el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la secuencia establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41.

471. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-470, en donde el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41.

472. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-471, en donde el segmento dirigido al ADN consiste en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 30-61, opcionalmente en donde el segmento dirigido al ADN consiste

en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 36, 30, 33, y 41.

473. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-472, en donde el ARN guía comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 62-125, opcionalmente en donde el ARN guía comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 68, 100, 62, 94, 65, 97, 73, y 105.

474. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-473, en donde:

(I) el segmento dirigido al ADN comprende al menos 17, al menos 18, al menos 19, o al menos 20 nucleótidos contiguos de la sec. con núm. de ident.: 36; y/o

(II) el segmento dirigido al ADN es al menos 90 % o al menos 95 % idéntico a la sec. con núm. de ident.: 36.

475. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-474, en donde el segmento dirigido al ADN comprende la sec. con núm. de ident.: 36.

476. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-475, en donde el segmento dirigido al ADN consiste en la sec. con núm. de ident.: 36.

477. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 68-476, en donde el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100.

478. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-477, en donde el ARN guía se encuentra en la forma de ARN.

479. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-478, en donde el ARN guía comprende al menos una modificación.

480. La composición de la reivindicación 479, en donde al menos una modificación comprende un nucleótido modificado con 2'-O-metilo.

481. La composición de la reivindicación 479 o 480, en donde al menos una modificación comprende una unión de fosforotioato entre nucleótidos.

482. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 479-481, en donde al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los primeros cinco nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

483. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 479-482, en donde al menos una modificación comprende una modificación en uno o más de los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

484. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 479-483, en donde al menos una modificación comprende uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

485. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 479-484, en donde al menos una modificación comprende uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

486. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 479-485, en donde al menos una modificación comprende nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía.

487. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 479-486, en donde al menos una modificación comprende nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

488. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 479-487, en donde al menos una modificación comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5'

del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

489. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-488, en donde el ARN guía es un ARN guía único (ARNsg).

490. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-489, en donde el ARN guía en la forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía.

491. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-490, en donde la proteína Cas es una proteína Cas9.

492. La composición de la reivindicación 491, en donde la proteína Cas9 se deriva de una proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, una proteína Cas9 de *Staphylococcus aureus*, una proteína Cas9 de *Campylobacter jejuni*, una proteína Cas9 de

Streptococcus thermophilus, o una proteína Cas9 de *Neisseria meningitidis*.

493. La composición de la reivindicación 491, en donde la proteína Cas se deriva de una proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes*.

494. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-493, en donde la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 11.

495. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-494, en donde el ácido nucleico que codifica la proteína Cas se optimiza por codones para la expresión en una célula de mamífero o una célula humana.

496. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-495, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas.

497. La composición de la reivindicación 496, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas comprende al menos una modificación.

498. La composición de la reivindicación 496 o 497, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas se modifica para comprender una uridina modificada en una o más o en todas las posiciones de uridina.

499. La composición de la reivindicación 498, en donde la uridina modificada es pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina.

500. La composición de la reivindicación 498 o 499, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye totalmente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina.

501. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 496-500, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas comprende una caperuza en 5'.

502. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 496-501, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas comprende una secuencia de poliadenilación.

503. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 496-502, en donde el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núms. de ident.: 226, 225, o 12.

504. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-503, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en las sec. con núms. de ident.: 226, 225 o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye totalmente con

pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación.

505. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-504, en donde el ARN guía en la forma de ARN y el ARN guía comprenden la sec. con núm. de ident.: 68 o 100, y

en donde la composición comprende administrar el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225, o 12.

506. La composición de la reivindicación 505, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal, y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la sec. con núm. de ident.: 176, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la glucosidasa alfa lisosomal,

en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y

en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

507. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-504, en donde el ARN guía en la forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía, y

en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende

un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 226, 225, o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye totalmente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación.

508. La composición de la reivindicación 507, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal, y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la sec. con núm. de ident.: 176, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la glucosidasa alfa lisosomal, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo,

opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

509. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-508, en donde la proteína Cas o el ácido nucleico que codifica la proteína Cas y el ARN guía o uno o más ADN que codifican el ARN guía se asocian con una nanopartícula lipídica.

510. La composición de la reivindicación 509, en donde la nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico, un lípido neutro, un lípido auxiliar, y un lípido sigiloso.

511. La composición de la reivindicación 510, en donde el lípido catiónico es el Lípido A ((9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-(((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato).

512. La composición de la reivindicación 510 o 511, en donde el lípido neutro es diestearoilfosfatidilcolina o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC).

513. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 510-512, en donde el lípido auxiliar es el colesterol.

514. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 510-513, en donde el lípido sigiloso es 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metoxipoli-etilenglicol-2000 (PEG2k-DMG).

515. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 510-514, en donde el lípido catiónico es el Lípido A, el lípido neutro es DSPC, el lípido auxiliar es colesterol y el lípido sigiloso es PEG2k-DMG.

516. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 509-515, en donde la nanopartícula lipídica comprende cuatro lípidos en las siguientes relaciones molares: aproximadamente 50 % mol de Lípido A, aproximadamente 9 % mol de DSPC, aproximadamente 38 % mol de colesterol, y aproximadamente 3 % mol de PEG2k-DMG.

517. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-516, en donde el gen *albúmina* es un gen de *albúmina* humano, en donde el ARN guía está en forma de ARN, y el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 68 o 100, en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, y el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia expuesta en la sec. con núm. de ident.: 226, 225, o 12, y

en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende Lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente 50 mol % de Lípido A, aproximadamente 9 mol % de DSPC, aproximadamente 38 mol % de colesterol, y aproximadamente 3 mol % de PEG2k-DMG.

518. La composición de la reivindicación 517, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal, y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la sec. con núm. de ident.: 176, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la glucosidasa alfa lisosomal, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende,

consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

519. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 467-516, en donde el gen *albúmina* es un gen de *albúmina* humano,

en donde el ARN guía en la forma de ARN, el ARN guía comprende la sec. con núm. de ident.: 100, y el ARN guía comprende: (i) uniones de fosforotioato entre los primeros cuatro nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; (ii) uniones de fosforotioato entre los últimos cuatro nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía; (iii) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los primeros tres nucleótidos en el extremo 5' del ARN guía; y (iv) nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en los últimos tres nucleótidos en el extremo 3' del ARN guía,

en donde la composición comprende el ácido nucleico que codifica la proteína Cas, en donde el ácido nucleico comprende un ARNm que codifica la proteína Cas, el ARNm que codifica la proteína Cas comprende la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 226, 225, o 12, y el ARNm que codifica la proteína Cas se sustituye totalmente con pseudouridina o N1-metil-pseudouridina, opcionalmente N1-metil-pseudouridina, comprende una caperuza 5' y comprende una secuencia de poliadenilación, y

en donde el ARN guía y el ARNm que codifica la proteína Cas se asocian con una nanopartícula lipídica que comprende Lípido A, DSPC, colesterol y PEG2k-DMG, opcionalmente en las siguientes relaciones molares: aproximadamente 50 mol % de Lípido A, aproximadamente 9 mol % de DSPC, aproximadamente 38 mol % de colesterol, y aproximadamente 3 mol % de PEG2k-DMG.

520. La composición de la reivindicación 519, en donde el constructo de ácido nucleico comprende de 5' a 3': un aceptor de empalme, la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal, y una señal o secuencia de poliadenilación, en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 174-182 y 205-212, opcionalmente en donde la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal comprende la sec. con núm. de ident.: 176, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un promotor que estimula la expresión de la glucosidasa alfa lisosomal, en donde el constructo de ácido nucleico no comprende un brazo de homología, y en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra en un vector rAAV8 monocatenario, opcionalmente en donde el constructo de ácido nucleico se encuentra flanqueado por repeticiones terminales inversas (ITR) en cada extremo, opcionalmente en donde la ITR en al menos un extremo comprende,

consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160, y opcionalmente en donde la ITR en cada extremo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la sec. con núm. de ident.: 160.

521. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-520, para usar en un método de inserción de la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células.

522. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-520, para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio de un locus genómico diana en una célula o una población de células o para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células.

523. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-520, para usar en un método de inserción de la secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto.

524. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-520, para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio de un locus genómico diana en una célula o una población de células en un sujeto o

para usar en un método para expresar la proteína terapéutica multidominio en una célula o una población de células en un sujeto.

525. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-520, para usar en un método para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que lo necesita.

526. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-520, para usar en un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que lo necesita.

527. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-520, para usar en un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita.

528. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-520, para usar en un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesita.

529. Una célula que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-520.

530. La célula de la reivindicación 529, en donde el constructo de ácido nucleico se integra en un locus genómico diana, y en donde la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana, o en donde el constructo de

ácido nucleico se integra en el intrón 1 de un locus *albúmina* endógeno, y en donde la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus *albúmina* endógeno.

531. La célula de la reivindicación 529 o 530, en donde la célula es una célula hepática.

532. La célula de la reivindicación 531, en donde la célula hepática es un hepatocito.

533. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 529-532, en donde la célula es una célula humana.

534. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 529-533, en donde la célula es una célula neonatal.

535. La célula de la reivindicación 534, en donde la célula neonatal es de un sujeto neonato humano dentro de las 24 semanas después del nacimiento.

536. La célula de la reivindicación 534, en donde la célula neonatal es de un sujeto neonato humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento.

537. La célula de la reivindicación 534, en donde la célula neonatal es de un sujeto neonato humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento.

538. La célula de la reivindicación 534, en donde la célula neonatal es de un sujeto neonato humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento.

539. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 529-533, en donde la célula no es una célula neonatal.

540. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 529-539, en donde la célula es *in vivo*.

541. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 529-539, en donde la célula es *in vitro* o *ex vivo*.

542. Un método para insertar una secuencia codificante de glucosidasa alfa lisosomal en un locus genómico diana en una célula o una población de células, que comprende administrar a la célula o la población de células la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 463-520, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana.

543. Un método para expresar una glucosidasa alfa lisosomal en una célula o una población de células, que comprende administrar a la célula o la población de células la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-462,

en donde la secuencia codificante de alfa-glucosidasa lisosómica está operativamente unida a un promotor en la construcción de ácido nucleico y se expresa en la célula o población de células.

544. Un método para expresar una glucosidasa alfa lisosomal de un locus genómico diana en una célula o una población de células, que comprende administrar a la célula o la población de células la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 463-520,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado.

545. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 542-544, en donde la célula es una célula hepática o la población de células es una población de células hepáticas, opcionalmente en donde la célula es un hepatocito o la población de células es una población de hepatocitos.

546. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 542-545, en donde la célula es una célula humana o la población de células es una población de células humanas.

547. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 542-546, en donde la célula es una célula neonatal o la población de células es una población de células neonatales.

548. El método de la reivindicación 547, en donde la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 24 semanas después del nacimiento.

549. El método de la reivindicación 547, en donde la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento.

550. El método de la reivindicación 547, en donde la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento.

551. El método de la reivindicación 547, en donde la célula neonatal o la población de células neonatales es de un sujeto neonatal humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento.

552. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 542-546, en donde la célula no es una célula neonatal o la población de células no es una población de células neonatales.

553. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 542-552, en donde la célula es *in vitro* o *ex vivo* o la población de células es *in vitro* o *ex vivo*.

554. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 542-552, en donde la célula es *in vivo* en un sujeto o la población de células es *in vivo* en un sujeto.

555. Un método para insertar una secuencia codificante de alfa glucosidasa lisosomal en un locus genómico diana en una célula de un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 463-520, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana.

556. Un método para expresar una alfa glucosidasa lisosomal en una célula de un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-462, en donde la secuencia codificante de alfa-glucosidasa lisosómica está operativamente unida a un promotor en la construcción de ácido nucleico y se expresa en la célula.

557. Un método para expresar una alfa glucosidasa lisosomal de un locus genómico diana en una célula de un sujeto, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 463-520,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado.

558. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 555-557, en donde la célula es una célula del hígado, opcionalmente en donde la célula es un hepatocito.

559. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 555-558, en donde la célula es una célula humana.

560. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 555-559, en donde la célula es una célula neonatal.

561. El método de la reivindicación 560, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 24 semanas después del nacimiento.

562. El método de la reivindicación 560, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas después del nacimiento.

563. El método de la reivindicación 560, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento.

564. El método de la reivindicación 560, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento.

565. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 555-559, en donde la célula no es una célula neonatal.

566. Un método para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-462, en donde la secuencia codificante de alfa-glucosidasa lisosómica está operativamente unida a un promotor en la construcción de ácido nucleico y se expresa en el sujeto.

567. Un método para tratar una deficiencia de alfa glucosidasa lisosomal en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 463-520, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado.

568. Un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-462, en donde la secuencia codificante de alfa glucosidasa lisosomal se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido.

569. Un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 463-520, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido.

570. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-569, en donde el sujeto tiene la enfermedad de Pompe.

571. Un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto

la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-462,

en donde la secuencia codificante de alfa glucosidasa lisosómica se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe.

572. Un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 463-520,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, tratando de esta manera la enfermedad de Pompe.

573. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 570-572, en donde la enfermedad de Pompe es la enfermedad de Pompe de aparición infantil.

574. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 570-572, en donde la enfermedad de Pompe es la enfermedad de Pompe de aparición tardía.

575. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-574, en donde el sujeto es un sujeto humano.

576. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-575, en donde el sujeto es un sujeto neonatal.

577. El método de la reivindicación 576, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento, opcionalmente en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas posteriores al nacimiento, dentro de las 8 semanas posteriores al nacimiento, o dentro de las 4 semanas posteriores al nacimiento.

578. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-575, en donde el sujeto no es un sujeto neonatal.

579. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-578, en donde el método resulta en un nivel terapéuticamente efectivo de glucosidasa alfa lisosomal circulante en el sujeto.

580. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-579, en donde el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, tejido cardíaco, o tejido del sistema nervioso central del sujeto.

581. El método de la reivindicación 580, en donde el método reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético y el tejido cardíaco en el sujeto.

582. El método de la reivindicación 581, en donde el método resulta en niveles reducidos de glucógeno en el músculo esquelético y tejido cardíaco en el sujeto comparable a los niveles silvestres a la misma edad.

583. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-582, en donde el método mejora la fuerza muscular en el sujeto o previene la pérdida de fuerza muscular en el sujeto en comparación con un sujeto de control.

584. El método de la reivindicación 583, en donde el método resulta en que el sujeto tenga una fuerza muscular comparable a los niveles silvestres a la misma edad.

585. Un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 434-462, en donde la secuencia codificante de alfa glucosidasa lisosómica se une operativamente a un promotor en el constructo de ácido nucleico y se expresa en el sujeto, previniendo o reduciendo de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto.

586. Un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 463-520, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana para crear un locus genómico diana modificado, y la glucosidasa alfa lisosomal se expresa a partir del locus genómico diana modificado, previniendo o reduciendo así la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto.

587. El método de la reivindicación 585 o 586, en donde la enfermedad de Pompe es la enfermedad de Pompe de aparición infantil.

588. El método de la reivindicación 585 o 586, en donde la enfermedad de Pompe es una enfermedad de Pompe de aparición tardía.

589. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 585-588, en donde el método resulta en un nivel terapéuticamente efectivo de glucosidasa alfa lisosomal circulante en el sujeto.

590. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 585-589, en donde el método previene o reduce

la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético, corazón, o tejido del sistema nervioso central del sujeto.

591. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 585-590, en donde el método previene o reduce la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético y el tejido cardíaco en el sujeto.

592. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 585-591, en donde el sujeto es un sujeto humano.

593. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 585-592, en donde el sujeto es un sujeto neonatal.

594. El método de la reivindicación 593, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 24 semanas posteriores al nacimiento, opcionalmente en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 12 semanas posteriores al nacimiento.

595. El método de la reivindicación 593, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 8 semanas después del nacimiento.

596. El método de la reivindicación 593, en donde el sujeto neonatal es un sujeto humano dentro de las 4 semanas después del nacimiento.

597. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 585-592, en donde el sujeto no es un sujeto neonatal.

598. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-597, en donde el método resulta en una mayor expresión de glucosidasa alfa lisosomal en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la glucosidasa alfa lisosomal a un sujeto de control.

599. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-598, en donde el método resulta en mayores niveles séricos de glucosidasa alfa lisosomal en el sujeto en comparación con un método que comprende administrar un vector de expresión episomal que codifica la glucosidasa alfa lisosomal a un sujeto de control.

600. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-599, en donde el método resulta en niveles séricos de la glucosidasa alfa lisosomal en el sujeto de al menos aproximadamente 1 µg/ml, al menos aproximadamente 2 µg/ml, al menos aproximadamente 3 µg/ml, al menos aproximadamente 4 µg/ml, al menos aproximadamente 5 µg/ml, al menos aproximadamente 6 µg/ml, al menos aproximadamente 7 µg/ml, al menos aproximadamente 8 µg/ml, al menos aproximadamente 9 µg/ml o al menos aproximadamente 10 µg/ml.

601. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-600, en donde el método resulta en niveles séricos de la glucosidasa alfa lisosomal en el sujeto de al menos aproximadamente 2 µg/ml o al menos aproximadamente 5 µg/ml.

602. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-601, en donde el método resulta en niveles séricos de la glucosidasa alfa lisosomal en el sujeto de entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 2 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml.

603. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-602, en donde el método resulta en niveles séricos de la glucosidasa alfa lisosomal en el sujeto de entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml o entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml.

604. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-603, en donde el método logra niveles de actividad de alfa glucosidasa lisosomal de al menos aproximadamente 40 % de lo normal, al menos aproximadamente 45 % de lo normal, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o 100 % de lo normal.

605. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-604, en donde:

(I) el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición infantil, y el método alcanza niveles de actividad o expresión de glucosidasa alfa lisosomal de al menos aproximadamente 1 % o más que aproximadamente 1 % de lo normal; o

(II) el sujeto tiene la enfermedad de Pompe de aparición tardía, y el método alcanza niveles de actividad o expresión de glucosidasa alfa lisosomal de al menos aproximadamente 40 % de lo normal, o más que aproximadamente 40 % de lo normal.

606. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-605, en donde la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 50 % de la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto a las 24 semanas después de la administración.

607. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-606, en donde la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 50 % de la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto un año después de la administración.

608. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-607, en donde la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 60 % de la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto a las 24 semanas después de la administración.

609. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-608, en donde la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 50 % de la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto dos años después de la administración.

610. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-609, en donde la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 60 % de la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto 2 años después de la administración.

611. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-610, en donde la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal es al menos 60 % de la expresión o actividad de la alfa glucosidasa lisosomal en un nivel máximo de expresión medido para el sujeto a las 24 semanas después de la administración.

612. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 554-611, en donde el método comprende además evaluar la inmunidad preexistente al AAV en el sujeto antes de administrar el constructo de ácido nucleico al sujeto.

613. El método de la reivindicación 612, en donde la inmunidad preexistente al AAV es inmunidad preexistente al AAV8.

614. El método de la reivindicación 612 o 613, en donde la evaluación de la inmunidad preexistente al AAV comprende la evaluación de la inmunogenicidad mediante el uso de un ensayo inmunitario de anticuerpos totales o un ensayo de anticuerpos neutralizantes.

615. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 542-614, en donde el constructo de ácido nucleico se administra simultáneamente con el agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

616. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 542-614, en donde el constructo de ácido nucleico no se administra simultáneamente con el agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

617. El método de la reivindicación 616, en donde el constructo de ácido nucleico se administra antes que el agente

de nucleasa o el uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

618. El método de la reivindicación 616, en donde el constructo de ácido nucleico se administra después del agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa.

619. Un método para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal en un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales, que comprende administrar a la célula neonatal o a la población de células neonatales:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro que se une a CD63 o un dominio de suministro que se une a TfR; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un

sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana.

620. Un método para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro que se une a CD63 fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal en un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales, que comprende administrar a la célula neonatal o a la población de células neonatales:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana.

621. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal de un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales, que comprende administrar a la célula neonatal o a la población de células neonatales:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro que se une a CD63 o un dominio de suministro que se une a TfR; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido

nucleico se inserta en el locus genómico objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado.

622. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro que se une a CD63 fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal de un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales, que comprende administrar a la célula neonatal o a la población de células neonatales:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana,

en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado.

623. Un método para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal en un locus genómico diana en una célula neonatal en un sujeto neonatal, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro que se une a CD63 o un dominio de suministro que se une a TfR; y

- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana.

624. Un método para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro que se une a CD63 fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal en un locus genómico diana en una célula neonatal en un sujeto neonatal, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana.

625. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una proteína glucosidasa alfa lisosomal de un locus genómico diana en una célula neonatal en un sujeto neonatal, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro que se une a CD63 o un dominio de suministro que se une a TfR; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico

objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado.

626. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro que se une a CD63 fusionado con una proteína glucosidasa alfa lisosomal de un locus genómico diana en una célula neonatal en un sujeto neonatal, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico objetivo

para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado.

627. Un método para tratar una deficiencia de glucosidasa alfa lisosomal en un sujeto neonatal que lo necesita, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro que se une a CD63 o un dominio de suministro que se une a TfR; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido

nucleico se inserta en el locus genómico objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado.

628. Un método para tratar una deficiencia de glucosidasa alfa lisosomal en un sujeto neonatal que lo necesita, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado,

y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado.

629. Un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto neonatal que necesita de este, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro que se une a CD63 o un dominio de suministro que se une a TfR; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico objetivo

para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido.

630. Un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto neonatal que necesita de este, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que

comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido.

631. Un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesita, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro que se une a CD63 o un dominio de suministro que se une a TfR; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico objetivo

para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado, para tratar de esta manera la enfermedad de Pompe.

632. Un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesita, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que

comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado, para tratar de esta manera la enfermedad de Pompe.

633. Un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesita, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro que se une a CD63 o un dominio de suministro que se une a TfR; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido

nucleico se inserta en el locus genómico objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado, para prevenir o reducir de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto.

634. Un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesita, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en un locus genómico diana,

en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado, para prevenir o reducir de esta manera la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto.

635. Una célula neonatal o una población de células neonatales preparada mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 619-634.

636. Una célula neonatal o una población de células neonatales que comprende un constructo de ácido nucleico insertada en un locus genómico diana, en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal insertada en un locus genómico diana, opcionalmente en donde el dominio de suministro es un dominio de suministro que se une a CD63 o un dominio de suministro que se une a TfR.

637. Una célula neonatal o una población de células neonatales que comprende un constructo de ácido nucleico insertada en un locus genómico diana, en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a CD63 fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal insertada en un locus genómico diana.

638. Un método para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro que se une a TfR fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal en un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales, que comprende administrar a la célula neonatal o a la población de células neonatales:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a TfR fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana,

en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana.

639. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro que se une a TfR fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal de un locus genómico diana en una célula neonatal o una población de células neonatales, que comprende administrar a la célula neonatal o a la población de células neonatales:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a TfR fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que

comprende el dominio de suministro de unión a TfR fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado.

640. Un método para insertar un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro que se une a TfR fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal en un locus genómico diana en una célula neonatal en un sujeto neonatal, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a TfR fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en el locus genómico diana, en donde el agente de nucleasa escinde el sitio diana de la nucleasa y el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico diana.

641. Un método para expresar una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro que se une a TfR fusionado con una proteína glucosidasa alfa lisosomal de un locus genómico diana en una célula neonatal en un sujeto neonatal, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a TfR fusionado con la glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de nucleasa en un gen diana en el locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a TfR fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado.

642. Un método para tratar una deficiencia de glucosidasa alfa lisosomal en un sujeto neonatal que lo necesita, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a TfR fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a TfR fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado.

643. Un método para reducir la acumulación de glucógeno en un tejido en un sujeto neonatal que necesita de este, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a TfR fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a TfR fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado y reduce la acumulación de glucógeno en el tejido.

644. Un método para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesita, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a TfR fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a TfR fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado, para tratar de esta manera la enfermedad de Pompe.

645. Un método para prevenir o reducir la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en un sujeto neonatal que lo necesita, que comprende administrar al sujeto neonatal:

- (a) un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a TfR fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal; y
- (b) un agente de nucleasa o uno o más ácidos nucleicos que codifican el agente de nucleasa, en donde el agente de nucleasa se dirige a un sitio diana de la nucleasa en un locus genómico diana, en donde el agente nucleasa escinde el sitio objetivo de nucleasa, el constructo de ácido nucleico se inserta en el locus genómico objetivo para crear un locus genómico objetivo modificado, y la proteína terapéutica multidominio que comprende el dominio de suministro de unión a TfR fusionado con la alfa-glucosidasa lisosomal se expresa a partir del locus genómico objetivo modificado, para prevenir o reducir de esta manera

la aparición de un signo o síntoma de la enfermedad de Pompe en el sujeto.

646. Una célula neonatal o una población de células neonatales preparada mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 638-645.

647. Una célula neonatal o una población de células neonatales que comprende un constructo de ácido nucleico insertada en un locus genómico diana, en donde el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia codificante para una proteína terapéutica multidominio que comprende un dominio de suministro de unión a TfR fusionado con una glucosidasa alfa lisosomal insertada en un locus genómico diana.